

ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ НОВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ МОРКВИ ПОСІВНОЇ КОРЕНЕПЛОДІВ ЕКСТРАКТУ ГУСТОГО ТА КВЕРЦЕТИНУ НА КУЛЬТУРІ КЛІТИН ЛІНІЇ L₉₂₉

Кононенко Т. Р.

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

kononenko929t@gmail.com

Вступ. Останнім часом дедалі більше принциповий характер набувають дебати навколо використання лабораторних тварин у наукових цілях, зокрема під час розробки лікарських засобів. Слід зауважити, що дослідження на тваринах, які проводяться з метою прогнозування токсичної дії лікарських засобів, піддаються широкій критиці не тільки з боку противників вівісекції, але й клініцистами, а також самими токсикологами. Вона стосується як етичних норм, так і наукової значимості одержуваних результатів. Зважаючи на фундаментальні відмінності в анатомії, фізіології, патології та метаболізмі людини та тварин дані ефективності та токсичної дії лікарських препаратів, які одержані на моделях з використанням тварин, часто не знаходять адекватного підтвердження в клініці.

Тому цілком обґрунтованим є розробка адекватних альтернативних методів дослідження, що передбачають заміну тварин на культури клітин, тканин та інше.

Якщо визначати загальну цитотоксичність як несприятливий вплив на структуру та властивості клітин, що впливає на їхнє виживання, проліферацію та функціонування, то на клітинному рівні можна виділити три основні механізми токсичної дії речовин: пошкодження клітинних мембран, порушення процесів метаболізму; порушення регуляції іонного складу та поділу клітин.

Рекомендується визначення загальної цитотоксичної дії на основі оцінки пригнічення проліферації клітин. Найкращим об'єктом для цього є недиференційована лінія клітин, які здатні до швидкого поділу.

При роботі з клітинними культурами найважливішим параметром є їхня життєздатність. Визначення здатності клітин до виконання функцій, зростання та поділу необхідно при проведенні широкого спектру досліджень, у тому числі: вивченні фізіологічних ефектів різних факторів; аналізі токсичності ксенобіотиків; тестуванні потенційних лікарських засобів тощо.

Загальним критерієм смерті клітини є порушення бар'єрної функції клітинної мембрани. У зв'язку з цим оцінка цілісності клітинної мембрани є одним із найбільш поширених способів визначення життєздатності клітин та оцінки цитотоксичних ефектів.

Мета. Оцінити *in vitro* цитотоксичну дію нового лікарського засобу на основі моркви посівної коренеплодів екстракту густого та кверцетину на культуру клітин лінії L₉₂₉.

Матеріали та методи. Дослідження виконані на перещеплюваній лінії клітин L₉₂₉, отриманої після 4 пасажів з кріоконсервованої культури, що зберігалася при температурі -196°C у кріобанку ІПКіК НАН України. Клітини

культивували у живильному середовищі DMEM/F12 («Biowest», Франція) з додаванням антибіотиків (200 Од/МП бензилпеніциліну («Arterium», Україна), 200 мкг/мл стрептоміцину («Arterium», Україна) та 10% ФТС при 37°C в атмосфері з 5% CO₂. Для культивування моношарової культури використовували пластикові чашки Петрі («SPL Life Sciences», Корея). Посівна концентрація клітин для отримання вихідної культури становила 1×10⁵ кл/мл. До чашок Петрі з конфлюентним моношаром клітин (4 доба після посіву) додавали різні концентрації досліджуваного лікарського засобу (40, 100, 200 мг/мл), розведених на живильному середовищі DMEM/F12. Інкубацію проводили протягом 40 хв при 37°C в атмосфері з 5% CO₂. Після цього, розчин відмивали тричі свіжим живильним середовищем, клітини відкріплювали від поверхні за допомогою сумішші (1:1) 0,5% трипсину («Sigma», США) та Версену («РАА», США). Витримували 5 хвилин при температурі 37°C. Після того, як клітини відкріплювалися від поверхні, їх збирали у пробірки (15 мл) та одноразово відмивали середовищем DMEM/F12 шляхом центрифугування.

Як контроль була культура клітин, що містить у живильному середовищі відповідну концентрацію кверцетину (200 мг/мл).

Збереженість клітин в отриманій суспензії оцінювали за допомогою фарбування 0,4%-м розчином трипанового синього, який додавали до суспензії клітин у співвідношенні 1:1. Цей барвник проникає через пошкоджену мембрану загиблих клітин, забарвлюючи їх в синій колір, при цьому живі клітини (з непошкодженою мембраною) їм не забарвлюються.

Фарбування трипановим синім дозволяє досить швидко оцінити життєздатність культури клітин, що не вимагає спеціальних дорогих реактивів та обладнання.

Клітини у зразках підраховували з використанням камери Горяєва. Збереженість визначали як відношення кількості незабарвлених (живих) клітин до їх загальної кількості, виражене у відсотках. Спостереження за клітинами, а також мікрофотозйомку здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопу AmScore XYL-403 (КНР).

Результати та їх обговорення. Лікарський засіб на основі моркви посівної коренеплодів екстракту густого та кверцетину не чинив цитотоксичного впливу на культуру клітин. Клітини лінії L₉₂₉, оброблені досліджуваним засобом у концентраціях 40, 100 та 200 мг/мл протягом 40 хвилин, не змінювали свою морфологію та не втрачали здібності до адгезії. Після інкубації був присутній моношар клітин з характерною морфологією. Засіб у концентраціях 40, 100 та 200 мг/мл забезпечував збереженість 98,6±0,9, 98,8±0,6, 98,4±1,1% клітин відповідно.

Висновки. Результати проведеного токсикологічного дослідження показали, що лікарський засіб на основі моркви посівної коренеплодів екстракту густого та кверцетину не чинить цитотоксичного впливу на культуру клітин лінії L₉₂₉ та може бути рекомендований для подальшого доклінічного дослідження з метою створення лікарського препарату з антиатерогенними та кардіопротекторними властивостями для профілактики та фармакокорекції серцево-судинної патології.